

VII-29

水俣湾底泥から新規に分離された芽胞形成水銀耐性細菌の水銀耐性トランスポゾンの多様性に関する研究

東北学院大学工学部	学生員	○佐藤充則
東北学院大学工学部		北浦久美子
日本学術振興会	正員	成田勝
国立中興大学生命科学部 (台湾)		黄介辰
東北学院大学工学部	フェロー	遠藤銀朗

1. はじめに

水銀による環境汚染は、我々の健康な生活や生態系を維持する上で重大な問題となっている。本研究ではこのような問題解決のために、水銀耐性細菌を利用した生物学的水銀除去技術の開発を目的として研究を進めている。以前、本研究室では熊本県の水俣湾底泥から数多くの芽胞形成水銀耐性細菌を分離し、これらの細菌株の保有する水銀耐性オペロン (*mer* オペロン)が、以前から研究のなされている *Bacillus cereus* RC607 株や *Bacillus megaterium* MB1 株の保有する *mer* オペロンと全く同一であることを明らかにしてきた。また、*B. cereus* RC607 株や *B. megaterium* MB1 株の保有する *mer* オペロンは、それぞれ Tn5084 および TnMER11 と命名されたクラス II トランスポゾン上にコードされていることが知られている。このことから、芽胞形成細菌間における *mer* オペロンの水平伝達の可能性が考えられた。しかしながら、本研究室で分離した各細菌株が、*mer* オペロンをクラス II トランスポゾン上にコードしているかどうかについては調べられていない。

よって、本研究では水俣湾底泥から分離された全く同一の *mer* オペロンを保有する芽胞形成細菌株を用いて、水銀除去能の評価とどのようなクラス II 水銀耐性トランスポゾンを保有しているかについて探索と解析を行った。

2. 実験材料および実験方法

2-1 供試細菌株

全く同一の *mer* オペロンを保有する好気性の芽胞形成細菌 *Bacillus* sp. MB5 株および *Bacillus* sp. MB23 株、通性嫌気性の芽胞形成細菌 *Bacillus* sp. MB24 株および *Bacillus* sp. MB29 株の計 4 細菌株を用いた。

2-2 塩化水銀に対する水銀除去能の評価

塩化水銀（初期濃度 10 μ M）を用いて各細菌株の水銀除去能を評価した。水銀除去能の評価はフレイムレス原子吸光計（SP-3D, Nippon Instruments Co., Tokyo, Japan）を使用して、培養液中の水銀残存量を測定することによって行った。

2-3 クラス II 水銀耐性トランスポゾンの探索と解析

各細菌株から抽出したトータル DNA を鋳型として、Long PCR 法によってクラス II 水銀耐性トランスポゾン領域の増幅を試みた。また、得られた各 PCR 産物の制限酵素地図を作成し相同性を解析した。

3. 実験結果および考察

3-1 塩化水銀に対する水銀除去能の評価結果

Fig. 1 に各細菌株の塩化水銀に対する水銀除去能の評価結果を示す。*Bacillus* sp. MB5 株、*Bacillus* sp. MB23 株、*Bacillus* sp. MB24 株および *Bacillus* sp. MB29 株の 24 時間培養後の水銀残存率は、それぞれ 16%、19%、20%および 15%であった。よって、効率よく水銀を除去することが明らかになった。

3-2 クラス II 水銀耐性トランスポゾンの探索と解析結果

クラス II 水銀耐性トランスポゾン領域を標的として Long PCR 増幅を行った結果、*Bacillus* sp. MB5 株からは、*B. megaterium* MB1 株の保有する TnMER11 と同じサイズの PCR 産物（14.2kbp）が得られ、*Bacillus* sp. MB23 株および *Bacillus* sp. MB29 株からは、*B. cereus* RC607 株の保有する Tn5084 と同じサイズの PCR 産物（11.5kbp）が得られた。しかしながら、*Bacillus* sp. MB24 株からは、TnMER11 や Tn5084 の各 PCR 産物よりも大きいサイズの PCR 産物が得られた（約 25~26kbp）（data not shown）。また、各 PCR 産物は *mer* オペロンプロンプと

ハイブリダイズされた (data not shown)。続いて、Fig. 2 に各 PCR 産物の制限酵素地図の作成結果を示す。*Bacillus* sp. MB5 株の PCR 産物の制限酵素地図は TnMER11 のそれと全く同一で、*Bacillus* sp. MB23 株および *Bacillus* sp. MB29 株の各 PCR 産物の制限酵素地図は Tn5084 のそれと全く同一であった。また、*Bacillus* sp. MB24 株の PCR 産物は *tnp* 遺伝子群と *mer* オペロンと推測される領域の間に 13~14kbp の長さの介在配列が存在すると考えられ、今まで知られているトランスポゾンとは大きさの異なる新規の水銀耐性トランスポゾンを保有すると考えられた。以上の結果より、水俣湾底泥に生息する芽胞形成細菌株の保有する水銀耐性トランスポゾンには、少なくとも大きさの異なる 3 つのタイプが存在することが明らかになった。

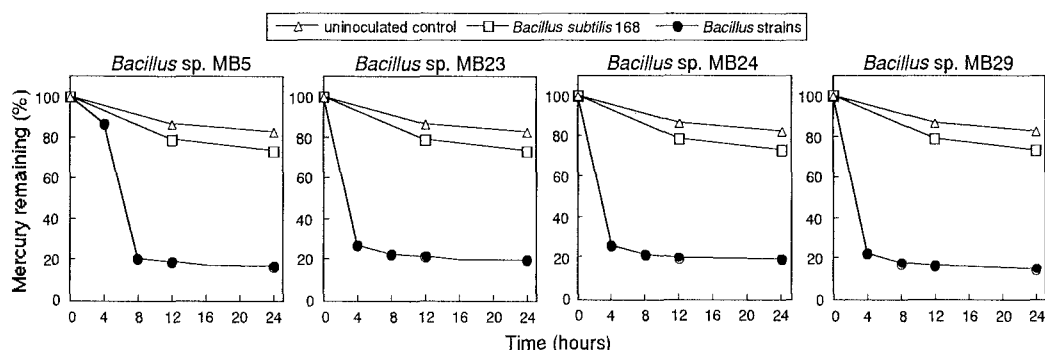


Fig. 1 塩化水銀 (初期濃度 10 μ M) に対する水銀除去能の評価結果

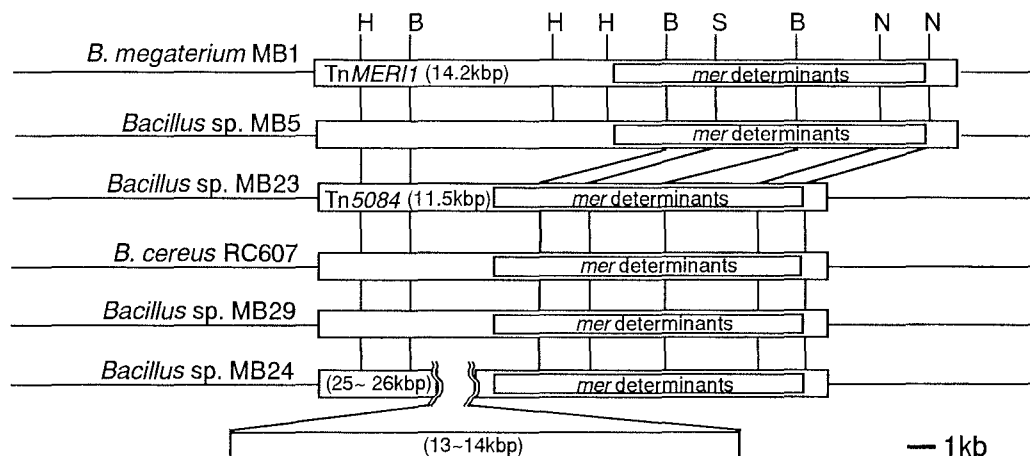


Fig. 2 各 PCR 産物の制限酵素地図作成結果

略語表記 : B; *Bgl*III, H; *Hind*III, S; *Sma*I, N; *Nco*I

4. おわりに

本研究で用いた芽胞形成水銀耐性細菌株の保有する *mer* オペロンの全ては、クラス II トランスポゾン上に存在していることが明らかになった。しかしながら、それらトランスポゾンの大きさや構造には多様性があることが知られた。このことは、水俣湾底泥に生息する好気性と通性嫌気性の芽胞形成細菌間で、様々な種類の転移因子によって全く同一の *mer* オペロンが水平伝達されたことを示している。また、水平伝達された *mer* オペロンを保有する細菌株が効率よく水銀を除去したことは、*mer* オペロンが各細菌株において発現し、水銀除去活性を持っていると考えられる。以上の得られた結果から、細菌の転移因子を利用した自然伝播メカニズムによる生物学的水銀除去技術への応用の可能性が考えられた。